



## UTILIZACIÓN DE MICROSATÉLITES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE HOMONIMIAS EN ACCESIONES DE *PHASEOLUS VULGARIS* L. DE LA COLECCIÓN DE FRIJOL DE HONDURAS

Meza, Narcizo

Unidad de Generación, Dirección de Ciencia y Tecnología Agropecuaria (DICTA).  
Avenida La FAO, Boulevard Miraflores. Tegucigalpa, Honduras.  
Correo electrónico: n.meza@alumnos.upm.es

### RESUMEN

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es una leguminosa muy importante en la dieta diaria en Honduras, representa el segundo grano básico en importancia nacional. En la Escuela Agrícola Panamericana se encuentra localizado el Banco de Germoplasma de frijol de Honduras, donde se conservan 497 accesiones. Para este estudio se han seleccionado 56 de esas accesiones, 30 de ellas denominadas “Vaina Blanca”, 20 con el nombre de “Arbolito”, cuatro “Arbolito Vaina Blanca” y dos “Vaina Blanca Arbolito”, lo cual representa el 11% de la colección. Para la identificación y detección de homonimias en dicho material vegetal mediante marcadores moleculares, se han utilizado 12 microsatélites previamente descritos en *P. vulgaris*. Los resultados obtenidos muestran la existencia de una gran variabilidad en las 56 accesiones estudiadas. Se han detectado 48 genotipos diferentes, de manera que resulta imposible asignar un genotipo concreto tanto para el cultivar “Vaina Blanca” como para “Arbolito”.

**Palabras clave:** judía, SSR, variabilidad genética

### INTRODUCCIÓN

La familia Leguminosae Juss. agrupa aproximadamente 18.000 especies y 650 géneros (Jones, 1995; Polhill et al., 1981). Según Hidalgo (1991), el género *Phaseolus* se localiza principalmente en los trópicos, subtropicos y zonas templadas, en donde se han descrito más de 30 especies, de las que sólo se cultivan cuatro, siendo *P. vulgaris* L. la más relevante. El frijol común (*P. vulgaris*) es una leguminosa muy importante en la dieta diaria en Honduras, representa el segundo grano básico en importancia nacional. En el Banco de Germoplasma de frijol de Honduras, localizado en la Escuela Agrícola Panamericana, se conservan 497 accesiones, existiendo más de doscientas variedades locales catalogadas.

El desarrollo de técnicas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha proporcionado una alternativa fiable y objetiva para la identificación de cultivares o accesiones, siendo los microsatélites o SSR (*simple sequence repeat*) uno de los marcadores más utilizados en ese sentido en *P. vulgaris* (Gómez et al., 2004; Blair et al., 2006). Los microsatélites son marcadores altamente reproducibles, lo cual permite el intercambio de datos entre laboratorios, así como la integración de los mismos en bases de datos internacionales. En la actualidad existen disponibles un gran número de *loci* microsatélites descritos específicamente para *P. vulgaris* (Yu et al., 2000; Gaitán-Solís et al., 2002; Blair et al., 2003, 2006), lo cual facilita la utilización de estos marcadores en estudios de caracterización de la diversidad genética e identificación del germoplasma de frijol.

Para el presente trabajo se han seleccionado 56 de de las 497 accesiones existentes en el Banco de Germoplasma de frijol de Honduras, con objeto de caracterizarlas mediante marcadores moleculares de tipo microsatélite.



## MATERIAL Y MÉTODOS

Para llevar a cabo este estudio se han seleccionado 56 accesiones de *P. vulgaris* del Banco de Germoplasma de frijol de Honduras, 30 de ellas denominadas “Vaina Blanca”, 20 con el nombre de “Arbolito”, cuatro “Arbolito Vaina Blanca” y dos “Vaina Blanca Arbolito” (Tabla 1), lo cual representa el 11% de la colección. Dicho germoplasma fue colectado entre 1991 y 1994 directamente en las fincas de los agricultores. En la extracción del ADN genómico total se utilizó una mezcla de material foliar de cinco plántulas para cada una de las accesiones. Dicha extracción se realizó siguiendo el protocolo del kit “Nucleo Spin Plant” (CLONTECH Lab.). El ADN extraído se cuantificó en gel de agarosa al 1,2% comparando la intensidad de las bandas con concentraciones conocidas del fago lambda. A continuación se prepararon diluciones de trabajo de 10 ng/μl en agua destilada y estéril.

**Tabla 1. Accesiones de *P. vulgaris* estudiadas. Se indica la localidad y el Departamento de colecta, así como el genotipo (Gn) de microsatélites obtenido para cada una de ellas.**

Código <sup>a</sup> accesión	Localidad (Departamento) de colecta	Gn SSR	Código <sup>a</sup> accesión	Localidad (Departamento) de colecta	Gn SSR
A-1	Tribu Xicaque La Bolsita (Yoro)	G1	VB-9	El Aguaje (Santa Barbara)	G26
A-2	Caridad (Yoro)	G2	VB-10	Plan Grande (Copán)	G27
A-3	Las Delicias (Valle)	G3	VB-11	S. Antonio de Las Crucitas (Copán)	G28
A-4	Guanacaste (Choluteca)	G4	VB-12	La Asomada (Lempira)	G29
A-5	Arenales de Belén (Lempira)	G5	VB-13	El Coyol (Copán)	G30
A-6	La Campa (Lempira)	G6	VB-14	Arenales (Santa Barbara)	G31
A-7	Arcilaca (Lempira)	G7	VB-15	Guacamaya (Santa Barbara)	G31
A-8	Guarita (Lempira)	G8	VB-16	Teoxintales (Santa Barbara)	G32
A-9	S. Anita (Ocotepeque)	G9	VB-17	El Español (El Paraíso)	G33
A-10	Plan del Rosario (Ocotepeque)	G10	VB-18	S. Antonio Conchagua (El Paraíso)	G34
A-11	Guacamaya (Santa Barbara)	G11	VB-19	El Boquerón (Choluteca)	G35
A-12	Arenales (El Paraíso)	G12	VB-20	Gualiqueme (Choluteca)	G36
A-13	Las Selvas (El Paraíso)	G13	VB-21	La Pintura (Choluteca)	G37
A-14	Los Limpios (Atlántida)	G14	VB-22	El Jicarito (Choluteca)	G38
A-15	La Hicaca (Yoro)	G11	VB-23	Los Limpios (Atlántida)	G39
A-16	El Terrero (Yoro)	G15	VB-24	Jocón (Yoro)	G40
A-17	N. Esmeralda (Fco Morazán)	G16	VB-25	La Hicaca	G41
A-18	Urrutia (Francisco Morazán)	G17	VB-26	Nueva Esmeralda (Fco Morazán)	G14
A-19	El Zapote (Intibucá)	G13	VB-27	Rodeo Chiquito (Fco Morazán)	G42
A-20	La Masica (Atlántida)	G18	VB-28	El Pedernal (Francisco Morazán)	G43
VB-1	Las Delicias (Yoro)	G19	VB-29	Guayabillas (Francisco Morazán)	G44
VB-2	Ayapa (Yoro)	G20	VB-30	La Hicaca (Yoro)	G43
VB-3	S. Simón (Yoro)	G21	AVB-1	San José Oriente (Santa Barbara)	G45
VB-4	Buenos Aires (Yoro)	G22	AVB-2	La Masica (Atlántida)	G8
VB-5	Las Delicias (Valle)	G23	AVB-3	Yaruca (Atlántida)	G46
VB-6	La Laguna (Colón)	G24	AVB-4	Yaruca (Atlántida)	G47
VB-7	El Coco (Santa Barbara)	G25	VBA-1	San José Oriente (Santa Barbara)	G48
VB-8	El Coco (Santa Barbara)	G14	VBA-2	Santa María (Atlántida)	G14

<sup>a</sup> A = “Arbolito”; VB = “Vaina Blanca”; AVB = “Arbolito Vaina Blanca”; VBA = “Vaina Blanca Arbolito”.

Se seleccionaron un total de 12 *loci* SSR previamente descritos en *P. vulgaris*: BM53, GATS91, BM199, BM175, BM137, BM210, BM211, BM212, BM184, BM209 (Gaitán-Solís et al., 2002), BMd1 (Blair et al., 2003, 2006) y PVAT007 (Yu et al., 2000). El criterio de selección fue su nivel de polimorfismo y su localización en diferentes cromosomas, de manera que cada uno de ellos se ubica en uno de los n=11 cromosomas de *P. vulgaris*, salvo BM210 y BM209, que se encuentran en el mismo cromosoma pero suficientemente alejados. El par de cebadores de cada microsatélite fue sintetizado por Applied Biosystems, de manera que uno de los cebadores de cada par fue marcado con un fluorocromo: 6-FAM, NED, VIC o PET. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen de 20 μl, con 0,2 mM de cada uno de los cuatro dNTPs, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 U de *Tth*-ADN-polimerasa en el tampón suministrado por el proveedor (BIOTOOLS B&M



Lab.), 20 ng de ADN molde y 0,2  $\mu$ M de cada cebador. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Mastercycler Eppendorf-5333 utilizando el mismo protocolo para los 12 SSR, que consistió en un ciclo inicial de desnaturalización de 3 min a 94°C, seguido por 35 ciclos de 45 s a 94°C, 1 min a 48°C y 1 min 30 s a 72°C, y un último ciclo de extensión de 5 min a 72 °C. Los productos amplificados se resolvieron en un secuenciador automático ABI PRISM 3730 y el tamaño de los alelos fue asignado utilizando el programa Peak Scanner™ v1.0 (Applied Biosystems).

Para cada uno de los *loci* microsatélite se obtuvieron las frecuencias alélicas y genotípicas por simple conteo. La heterocigosis observada ( $H_o$ ) fue calculada como el cociente entre el número de genotipos heterocigotos y el total de genotipos obtenidos para cada *locus*. La heterocigosis esperada se calculó como  $H_e = 1 - \sum p_i^2$ , donde  $p_i$  es la frecuencia del alelo “i” en la muestra estudiada para cada locus (Nei, 1987). Asimismo, también se estimó el número efectivo de alelos como  $NEA = 1 / \sum p_i^2$  (Kimura y Crow, 1964). Por otra parte, se calculó el poder de discriminación ( $D$ ; Jones, 1972), como la probabilidad teórica de que dos accesiones puedan ser distinguidas por sus patrones de SSR. Este parámetro fue calculado para cada *locus* “j” como  $D_j = 1 - C_j$ , donde  $C_j$  es la probabilidad de coincidencia. El poder de discriminación acumulado se calculó como  $D = 1 - C$ , donde  $C = \sum C_j$  es la probabilidad de coincidencia acumulada para todos los *loci* polimórficos analizados.

## RESULTADOS

De los 12 *loci* SSR utilizados, nueve fueron multialélicos, mientras que los tres restantes sólo presentaron un único alelo. El número de alelos detectados varió entre uno en los *loci* monomórficos (BM199, BM137 y BM212) y 22 en el *locus* BM211, con un total de 86 alelos considerando los 12 *loci*. En tres de los nueve *loci* polimórficos (BM211, BM53 y PVAT007), el número efectivo de alelos fue superior a cinco (Tabla 2).

**Tabla 2. Número (NA) y número efectivo (NEA) de alelos, número de genotipos observados ( $G_o$ ), Heterocigosis observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ), probabilidad de coincidencia ( $C$ ) y poder de discriminación ( $D$ ), obtenidos para los 9 *loci* SSR polimórficos analizados en las 56 accesiones de *P. vulgaris* L. estudiadas.**

<i>Locus</i>	NA	NEA	$G_o$	$H_o$	$H_e$	$C$	$D$
BM53	18	6,46	21	0,107	0,845	0,143	0,857
GATS91	12	4,28	18	0,214	0,766	0,195	0,805
BMd1	5	3,03	5	0	0,670	0,330	0,670
BM175	2	1,26	3	0,018	0,205	0,777	0,223
BM210	3	1,55	5	0,107	0,356	0,559	0,441
BM211	22	6,55	27	0,214	0,874	0,107	0,893
PV-AT007	8	5,05	16	0,236	0,802	0,128	0,872
BM184	3	1,49	4	0,125	0,330	0,568	0,432
BM209	10	3,08	11	0,091	0,676	0,312	0,688
<b>Media</b>	<b>9,22</b>	<b>3,64</b>	<b>---</b>	<b>0,124</b>	<b>0,614</b>	<b>---</b>	<b>---</b>
<b>Acumulado</b>	<b>---</b>	<b>---</b>	<b>---</b>	<b>---</b>	<b>---</b>	<b>9,7 x 10<sup>-6</sup></b>	<b>0,9999903</b>

Considerando únicamente los nueve *loci* polimórficos, el número de genotipos observados varió entre tres en BM175 y 27 en BM211. La combinación de los patrones



obtenidos en los nueve *loci* permitió diferenciar 48 genotipos distintos en las 56 accesiones estudiadas (85,7%). La heterocigosis observada varió entre 0 (BMd1) y el 23,6% (PVAT007), con un valor medio de 12,4% (Tabla 2). Por otra parte, la heterocigosis esperada varió entre el 20,5% (BM175) y el 87,4% (BM211), con una media del 61,4% (Tabla 2). Los valores de heterocigosis esperada fueron significativamente superiores a los correspondientes de heterocigosis observada, lo cual puede ser el reflejo de la condición eminentemente autógama de *P. vulgaris*, aunque presente cierto porcentaje de alogamia (Polhill et al., 1981).

Los valores de la probabilidad de coincidencia (C) y el poder de discriminación (D) obtenidos para cada uno de los nueve *loci* polimórficos, junto con sus valores acumulados para el conjunto de los *loci*, se muestran en la Tabla 2. El *locus* BM175 muestra el valor del poder de discriminación más bajo (0,223), mientras que existen cuatro *loci* con valores superiores al 80% (BM211, PVAT007, BM53 y GATS91). Asimismo, el valor acumulado para los nueve *loci* de dicho poder de discriminación teórico es prácticamente del 100% (0,9999903; Tabla 2), aunque en la práctica sólo se han podido diferenciar el 85,7% de las 56 accesiones estudiadas. Esto último, probablemente sea debido a que las accesiones que han presentado los mismos patrones de SSR, realmente se trate del mismo material genético.

### CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo ponen claramente de manifiesto la capacidad de los microsatélites utilizados para detectar suficiente polimorfismo como para diferenciar un germoplasma vegetal tan relacionado como el aquí estudiado. La variabilidad encontrada en las 56 accesiones es tal (48 genotipos diferentes) que resulta prácticamente imposible asignar un genotipo concreto para cualquiera de los dos cultivares principales en estudio, “Vaina Blanca” y “Arbolito”.

Asimismo, se sugiere la utilización de, al menos, los cuatro *loci* con mayor poder de discriminación (BM211, PVAT007, BM53 y GATS91) para llevar a cabo el estudio del resto de las 497 accesiones de *P. vulgaris* existentes en el Banco de Germoplasma de frijol de Honduras. Lo cual permitiría generar una base de datos que podría utilizarse para la propia gestión y uso de la colección de frijol, así como para la identificación de cultivares, estudios de parentesco e incluso en cuestiones de protección legal de cultivares o accesiones de *P. vulgaris*.

### AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Departamento de Biología Vegetal de la UPM y, en especial, al Dr. Jesús M. Ortiz por el financiamiento para el desarrollo de este trabajo. Agradecer al Dr. Juan Carlos Rosas (Banco Germoplasma de Frijol en Honduras) por permitirme estudiar una parte de su colección de frijol (*Phaseolus vulgaris*). Y muy especialmente al Dr. Juan Pedro Martín Clemente por su paciencia y entrega de largas jornadas de tutoría.

### BIBLIOGRAFÍA

- Blair M.W., Giraldo M.C., Buendía H.F., Tovar E., Duque M.C., Beebe S.E. 2006. Theor. Appl. Genet., 113: 100-109.
- Blair M.W., Pedraza F., Buendía H.F., Gaitán-Solís E., Beebe S.E., Gepts P., Tohme J. 2003. Theor. Appl. Genet., 107: 1362-1374.
- Gaitán-Solís E., Duque M.C., Edwards K.J., Tohme J. 2002. Crop Sci., 42: 2128-2136.
- Gómez O.J., Blair M.W., Frankow-Lindberg B.E., Gullberg U. 2004. Crop Sci., 44:1412-1418.
- Hidalgo R. 1991. In: Common beans: Research for crop improvement. CAB International, Cali, Colombia. p 163-197.
- Jones D.A. 1972. J. Forens. Sci. Soc., 12: 355-359.
- Jones G. 1995. Taxon, 4: 188-189.
- Kimura M., Crow J.F. 1964. Genetics, 49: 725-738.
- Nei M. 1987. In: Population genetics and fishery management. Univ. Washington Press, Seattle. p 193-223.
- Polhill R., Raven W., Stirton C.1981. In: Advances in Legume Systematics. Vol. I. Royal Botanic Garden, Kew, England. p 1-26
- Yu K., Park S.J., Poysa V., Gepts P. 2000. J. Hered., 91: 429-434.